

اثر هیپوتیروئیدیسم تجربی بر فعالیت آنزیمهای هگزوکیناز، لاکتات دهیدروژناز و آکونیتاز در مغز Rat در طول رشد

مرتضی نیکوکار*

چکیده:

مطالعات انجام شده بر روی تأثیر هورمونهای تیروئیدی در رشد دستگاه عصبی بیانگر نقش عظیم این هورمونها در تکامل بافت مذکور می باشد. از آنجا که گلوکز منبع اصلی تولید انرژی در مغز می باشد. در این تحقیق اثر کاهش هورمونهای تیروئید بر روی فعالیت آنزیمهای هگزوکیناز، لاکتات دهیدروژناز و آکونیتاز همراه با اندازه گیری غلظت گلوکز و گلیکوژن در مغز Rat مورد بررسی قرار گرفت. نتایج، نشان دهنده عدم تغییر در فعالیت آنزیم آکونیتاز، کاهش فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز و افزایش فعالیت آنزیم هگزوکیناز می باشد. میزان گلیکوژن در تمام مراحل رشد و گلوکز تنها در سن بلوغ افزایش نشان می دهد. کاهش فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز و عدم تغییر در فعالیت آنزیم آکونیتاز می تواند بیانگر کاهش مسیر گلیکولیز باشد، در حالی که افزایش فعالیت آنزیم هگزوکیناز بیانگر افزایش برداشت گلوکز توسط این بافت در کم کاری تجربی غده است. با توجه به عدم افزایش فعالیت مسیر گلیکولیز علیرغم برداشت زیاد گلوکز توسط این بافت و افزایش ذخیره گلیکوژن در هیپوتیروئیدیسم تجربی، می توان به افزایش فعالیت مسیر متابولیکی گلیکوژن در این حالت توجه نمود. از آنجا که سلولهای مغزی در حالت عادی دارای ذخیره گلیکوژن نمی باشند، شاید بتوان ذخیره زیاد گلیکوژن در این بافت را در بروز اختلالات مغزی در هیپوتیروئیدیسم مؤثر دانست.

واژه های کلیدی: هیپوتیروئیدیسم، هگزوکیناز، لاکتات دهیدروژناز، آکونیتاز، متی مازول

مقدمه:

می باشند، اما وجود تیروکسین برای رشد سلولهای مغز کاملاً ضروری بوده و کاهش در ترشح این هورمون در دوران اول زندگی، رشد مغز را شدیداً به تأخیر می اندازد. در حالی که این اثر در مورد کاهش هورمون رشد مشاهده نمی شود (۳).

هورمونهای تیروئیدی باعث افزایش مصرف اکسیژن در تمام بافتهای بدن به استثنای مغز، بیضه و طحال می شوند (۶)، با توجه به این امر که منبع اصلی تأمین انرژی در بافت عصبی، گلوکز می باشد (۷)، مطالعه متابولیسم این ترکیب در کاهش سنتز هورمونهای

مطالعات نشان می دهد که اثر هورمونهای غده تیروئید بر رشد سلسله اعصاب، حائز اهمیت بسیار است و آثاری که از کمبود این هورمونها در مغز به وجود می آید، در هیچ بافتی به این اندازه عمیق و غیر قابل جبران نیست (۱۰). تحقیقات متعددی بیانگر این امر می باشد که کاهش هورمونهای تیروئید، با عدم رشد سلولهای مغزی همراه می باشد (۴)، و تیروکسین بر روی رشد و نمو قسمتهای مختلف مغز، مخصوصاً مخچه مؤثر است (۸). با آن که هورمونهای غده تیروئید و هورمون رشد هر دو برای رشد عمومی بدن لازم

*عضو هیأت علمی گروه بیوشیمی - دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد

روش اندازه‌گیری فعالیت آنزیم هگزوکیناز (۱، ۷، ۲): جهت بررسی فعالیت این آنزیم از روش اسپکتروفتومتری استفاده شد. H^+ حاصل از تأثیر این آنزیم بر روی گلوکز در حضور ATP باعث تغییر رنگ کرزول رد می‌گردد که تغییراتی به میزان ۰/۰۳۵ در طول موج ۵۰۰ نانومتر بیانگر یک میکرومول اسید آزاد شده و یا گلوکز فسفریله می‌باشد (۲). از رابطه زیر می‌توان فعالیت مخصوص آنزیم را محاسبه نمود.

$$\text{فعالیت} = \frac{\Delta A/\text{min}}{0.035} \times \text{ضریب رقت} (\mu \text{ mol}/\text{min}/\text{L})$$

$$\text{فعالیت مخصوص آنزیم} = \frac{\text{فعالیت (U/L)}}{\text{پروتئین (mg/L)}} (\mu \text{ mol}/\text{mg}/\text{min})$$

نحوه اندازه‌گیری فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز (LDH) (۱، ۲۷، ۱):

آنزیم LDH سبب احیاء اسید پیرویک و تبدیل آن به اسید لاکتیک می‌شود که کوآنزیم آن $NADH + H^+$ است و کاهش $NADH + H^+$ و در نتیجه افزایش NAD^+ سبب کاهش جذب نور در طول موج ۳۴۰ نانومتر می‌شود که از این طریق می‌توان فعالیت آنزیم را اندازه‌گیری نمود (۲).

$$\text{فعالیت} = \frac{\Delta A/\text{min}}{6.22 \times 10^{-3}} \times 10^6 \times \text{ضریب رقت} (\mu \text{ mol}/\text{mg}/\text{min})$$

(6.22×10^{-3} ضریب جذب مولی و 10^6 ضریب تبدیل مولکول گرم به میکرومول می‌باشد).

$$\text{فعالیت مخصوص آنزیم} = \frac{\text{فعالیت (U/L)}}{\text{پروتئین (mg/L)}} (\mu \text{ mol}/\text{mg}/\text{min})$$

متد اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آکونیتاز (۳، ۲، ۴): آنزیم آکونیتاز طی دو مرحله اسید سیتریک را به اسید ایزوسیتریک تبدیل می‌کند که ماده حد واسط اسیدسیس آکونیتیک می‌باشد. این اسید بیشترین جذب نور را در طول موج ۲۴۰ نانومتر دارا می‌باشد که می‌توان

تیروئیدی، می‌تواند اهمیت نقش این هورمون‌ها را بر روی متابولیسم انرژی در مغز نشان دهد. در این بررسی فعالیت آنزیم هگزوکیناز، لاکتات دهیدروژناز و آکونیتاز همراه با میزان تغییرات گلوکز و گلیکوژن در بافت مغز هموزن شده در طول رشد در هیپوتیروئیدیسم تجربی در مقایسه با حالت طبیعی مورد ارزیابی قرار گرفت.

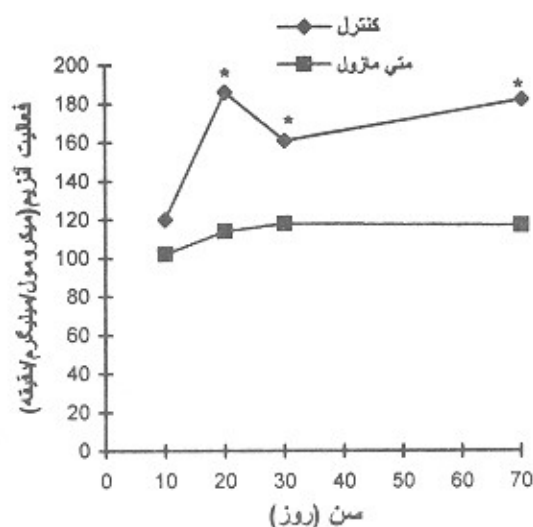
بررسی فعالیت آنزیم هگزوکیناز در راستای نقش این آنزیم در برداشت گلوکز در بافت مغز و فعالیت مسیر متابولیکی گلیکولیز و آنزیمهای لاکتات دهیدروژناز و آکونیتاز در جهت ورود یا عدم ورود اسید پیرویک حاصل از مسیر متابولیکی به داخل سیکل کربس می‌باشد.

مواد و روشها:

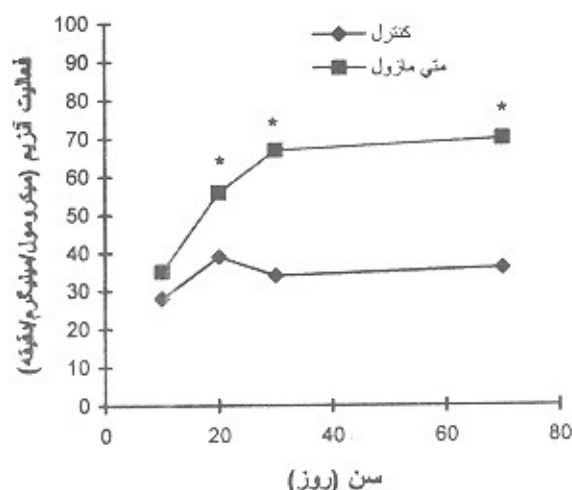
Rat های مورد استفاده در این آزمایش از نژاد Wistar و به نام علمی *Rattus norvegicus* بودند. این بررسی بر روی ۲ گروه Rat (گروه اول تحت تأثیر داروی متی مازول و به میزان ۵ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن و گروه دوم به عنوان کنترل تحت تزریق سرم فیزیولوژی) و در ۴ رده سنی (۱۰-۱۱، ۲۰-۲۱، ۳۰-۳۱، ۷۰-۶۱ روزگی) انجام گرفت. تزریق هر روز یک نوبت (ساعت ۸ صبح) و به مدت ۱۰ روز صورت پذیرفت (۱).

متی مازول یکی از داروهای ضد تیروئید و از گروه تیوآمیدها می‌باشد، که می‌تواند با جلوگیری از ترکیب ید با تیروزین‌های موجود بر روی مولکول تیروگلوبین و احتمالاً از طریق مهار آنزیم پراکسیداز، از سنتز هورمونهای تیروئیدی جلوگیری به عمل آورد (۹).

بررسی بر روی forebrain انجام گرفت که نیمی از آن برای آزمایشهای آنزیمی و با استفاده از بافر فسفات سدیم به صورت هموزن در آمد و از نیم دیگر در حضور محلول دپروتئینه کننده، برای بررسی میزان گلوکز و گلیکوژن هموزن تهیه شد. از روش T-test نیز جهت آزمون آماری در این تحقیق استفاده گردید.



نمودار شماره ۲: تغییرات فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز در مغز Rat در طی دوره‌های زمانی مشخص و رژیم دارویی (*P<0.05)



نمودار شماره ۱: تغییرات فعالیت آنزیم هگزوکیناز در مغز Rat در طی دوره‌های زمانی مشخص و تحت رژیم دارویی (* P<0.05)

روش اندازه‌گیری گلیکوژن:

جهت تعیین مقدار گلیکوژن از تأثیر اسیدهای غلیظ بر کربوهیدراتها و تولید مشتقات فورفورال استفاده شد. این مشتقات در مجاورت فنل‌ها متراکم شده و تولید کمپلکس رنگی می‌نمایند. میزان جذب نور در طول موج ۵۲۰ نانومتر با میزان تولید این ترکیبات متناسب می‌باشد (۲).

$$(mg/ml) \text{ غلظت استاندارد گلوکز} \times \frac{\text{ابزوریانس آزمایش}}{\text{ابزوریانس استاندارد گلوکز}} = \text{میزان گلوکز تام}$$

$$(mg/ml) \text{ میزان گلوکز آزاد مغز} - \text{میزان گلوکز تام مغز} = \text{میزان گلیکوژن مغز}$$

روش اندازه‌گیری پروتئین:

اسید فسفومولیدوتنگستیک می‌تواند با کمپلکس پروتئین و مس حاصل از واکنش بیوره به علت وجود اسیدهای آمینه تیروزین و تریپتوفان ترکیب شده و ایجاد رنگ آبی کند. مقدار اسید آمینه تیروزین با مقدار پروتئین متناسب بوده و با این روش می‌توان به میزان پروتئین نیز

با اندازه‌گیری تغییرات جذب نور در این طول موج فعالیت آنزیم را اندازه‌گیری نمود. افزایش جذب نور به میزان ۰/۰۰۱ در دقیقه، بیانگر تولید یک میکرومول اسید سیس‌آکونیتیک می‌باشد (۲).

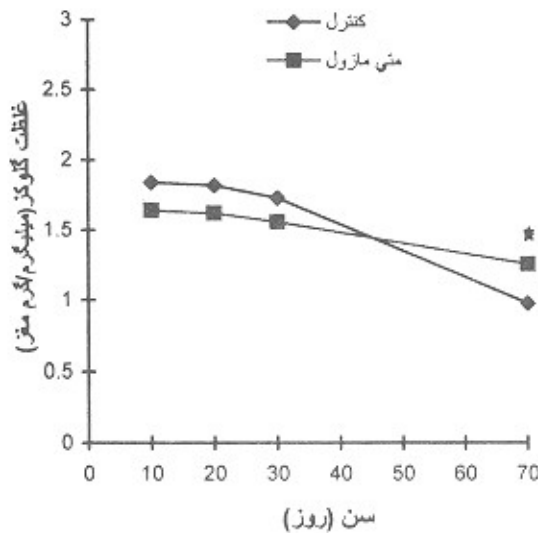
$$\text{فعالیت} = \frac{\Delta A/min}{0/001} \times \text{ضریب رقت} (\mu \text{ mol/mg/L})$$

$$\text{فعالیت مخصوص آنزیم} = \frac{\text{فعالیت (U/L)}}{\text{پروتئین (mg/L)}} (\mu \text{ mol/mg/min})$$

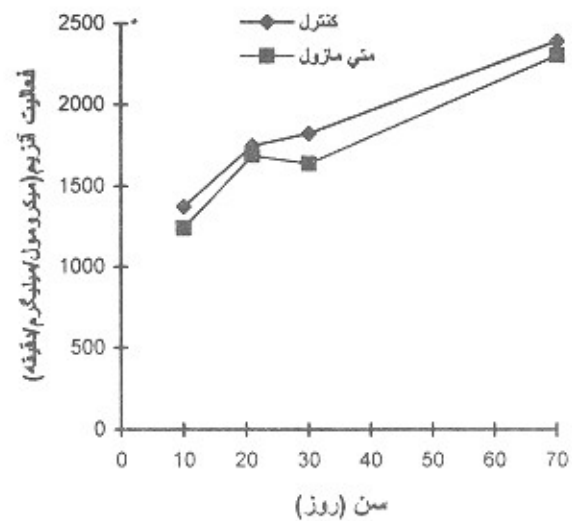
روش اندازه‌گیری میزان گلوکز:

تعیین میزان گلوکز در این تحقیق با روش ارتوتولوئیدین صورت پذیرفت. مقدار جذب نور مشتق رنگی حاصل از این آزمایش در طول موج ۶۳۰ نانومتر در مقایسه با محلول استاندارد، می‌تواند مقدار گلوکز موجود در نمونه را مشخص سازد (۲).

$$(mg/ml) \text{ غلظت استاندارد گلوکز} \times \frac{\text{ابزوریانس آزمایش}}{\text{ابزوریانس استاندارد گلوکز}} = \text{مقدار گلوکز}$$



نمودار شماره ۴: تغییرات میزان گلوکز مغز Rat در طی دوره‌های زمانی مشخص و رژیم دارویی ($P < 0.05$)



نمودار شماره ۳: تغییرات فعالیت آنزیم آکونیتاز در مغز Rat در طی دوره‌های زمانی مشخص و رژیم دارویی

بروز نکرده است. نمودار شماره ۲ تغییرات فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز را در حالت هیپوتیروئیدیسیم در مقایسه با کنترل نشان می‌دهد. مشاهده می‌شود که آنزیم LDH بیشترین افزایش فعالیت خود را در حالت طبیعی (کنترل) تقریباً در ۲۰ روز اول زندگی نشان می‌دهد و بعد از آن تغییر قابل توجهی در فعالیت این آنزیم به وجود نیامده است. میزان فعالیت این آنزیم در حالت کم‌کاری تجربی غده تیروئید در تمام طول رشد کاهش یافته است، که این کاهش تنها در ۱۰ روزگی معنی‌دار نیست و در بقیه دوران رشد قابل ملاحظه می‌باشد ($P < 0.05$).

نمودار شماره ۳ تغییرات فعالیت آنزیم آکونیتاز را در طول رشد نشان می‌دهد. در هر ۲ گروه، بیشترین افزایش در فعالیت آنزیم، مربوط به ۲۰ روز ابتدای زندگی بوده و پس از این مدت افزایش در فعالیت آنزیم در هر دو گروه به آرامی و با شیبی ملایم صورت گرفته است و فعالیت آنزیم در هر دو حالت تقریباً مشابه یکدیگر می‌باشد.

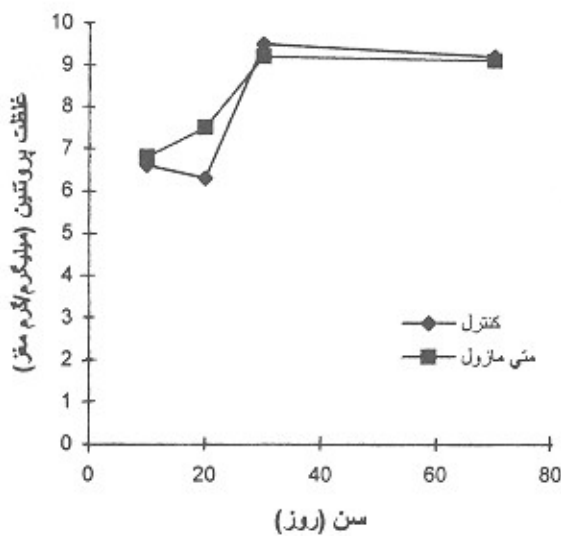
مطالعه بر روی میزان گلوکز در طول رشد مغز در

پی برد (۲). آزمایش با استفاده از اسپکتروفتومتر و در طول موج ۷۵۰ نانومتر صورت پذیرفت.

$$(mg/ml) \text{ غلظت استاندارد پروتئین } \times \frac{\text{آنزیم نام نمونه}}{\text{آنزیم نام استاندارد پروتئین}} = \text{مقدار پروتئین نمونه}$$

نتایج:

در نمودار شماره ۱ میزان تغییرات فعالیت آنزیم هگزوکیناز در مغز Rat در طول رشد در حالت هیپوتیروئیدیسیم تجربی در مقایسه با کنترل نشان داده شده است. طی دوران رشد در گروه کنترل حداکثر فعالیت این آنزیم تقریباً ۲۰ روز بعد از تولد مشاهده می‌شود و بعد از آن میزان فعالیت آنزیم تا حدودی کاهش می‌یابد که از نظر آماری معنی‌دار نیست. در حالت هیپوتیروئیدیسیم افزایش فعالیت این آنزیم دیده می‌شود، که میزان این افزایش در Rat‌های ۱۰ روزه قابل ملاحظه نیست، ولی در Rat‌های ۳۰ روزه تا حدود ۹۰٪ افزایش در فعالیت این آنزیم مشاهده می‌گردد و از آن پس می‌توان گفت که تغییرات معنی‌داری در فعالیت این آنزیم



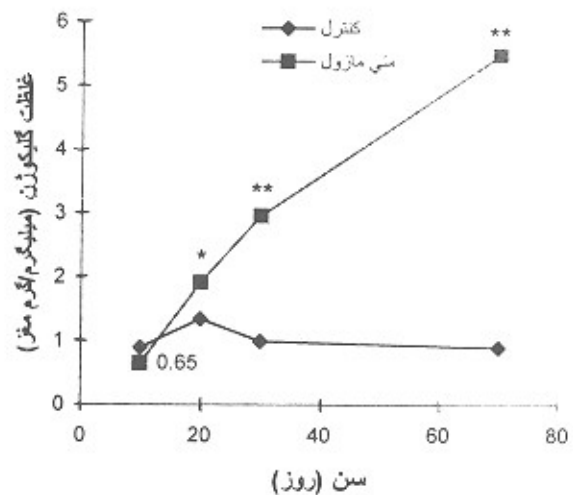
نمودار شماره ۶: تغییرات میزان پروتئین تام مغز Rat در طی دوره‌های زمانی مشخص و رژیم دارویی

در Rat‌های ۷۰ روزه مبتلا به هیپوتیروئیدیسم تجربی در مقایسه با حالت کنترل بسیار چشمگیر می‌باشد و از ۰/۹ میلی‌گرم در هر گرم بافت مغز به ۵/۵ میلی‌گرم در هر گرم از این بافت می‌رسد، که افزایشی در حدود ۶ برابر می‌باشد.

نمودار شماره ۶ نیز میزان پروتئین تام مغز را در طول رشد در هر ۲ گروه نشان می‌دهد. بررسی میزان پروتئین در هر دو گروه تقریباً نشان دهنده عدم تغییر میزان این ترکیب در حالت کم کاری نسبت به کنترل می‌باشد. به طور کلی می‌توان گفت که میزان پروتئین در هر دو گروه مورد آزمایش تقریباً یکسان بوده و زیاد دستخوش تغییرات نمی‌گردد.

بحث:

بررسی میزان گلوکز به عنوان سوسترای اصلی در متابولیسم انرژی مغز در حالت هیپوتیروئیدیسم و نرمال در توجیه و بررسی تغییرات فعالیت آنزیمهای کاتالیز کننده آن در این حالت پاتولوژیک در طول رشد مؤثر می‌باشد. آزمایشهای انجام شده بر روی میزان فعالیت



نمودار شماره ۵: تغییرات میزان گلیکوژن مغز Rat در طی دوره‌های زمانی مشخص و رژیم دارویی ($P < 0.05$)* ($P < 0.01$)**

Rat‌ها نشان می‌دهد که یک کاهش نسبی در میزان این ترکیب به ازای افزایش سن در هر ۲ گروه وجود دارد (نمودار شماره ۴). البته بایستی در نظر داشت که این کاهش در ماه اول زندگی در Rat‌های نرمال زیاد نیست ولی در حالت بلوغ (۷۰ روزگی) کاهش محسوسی را نشان می‌دهد. در حالت هیپوتیروئیدیسم میزان گلوکز در ماه اول کمی کمتر از حالت کنترل می‌باشد، ولی این امر در دوران بلوغ مشاهده نشده و اندکی افزایش در میزان آن دیده می‌شود که از نظر آماری معنی‌دار می‌باشد.

نمودار شماره ۵ نمایانگر تغییرات میزان گلیکوژن در دوره‌های سنی مختلف در حالت هیپوتیروئیدیسم و نرمال می‌باشد. مقایسه Rat‌های مبتلا به هیپوتیروئیدیسم با گروه کنترل بیانگر وجود یک افزایش شدید در ذخیره گلیکوژن مغزی این گروه از حیوانات می‌باشد. این میزان افزایش در روزهای ابتدای زندگی (۱۰ روزگی) دیده نمی‌شود ولی در ۲۰ روزگی به صورتی محسوس و در ۳۰ روزگی به طور قابل توجهی مشاهده می‌شود (حدود ۳ برابر). میزان این افزایش

آنزیم هگزوکیناز نشان می دهد که این آنزیم در حالت هیپوتیروئیدیسم تجربی نسبت به کنترل دارای فعالیت بیشتری است (نمودار شماره ۱). افزایش فعالیت آنزیمهایی مانند هگزوکیناز در مغز در حالت پرکاری غده تیروئید امری طبیعی می باشد که به علت افزایش غلظت هورمونهای این غده و تأثیر آنها بر روی DNA در جهت افزایش سنتز آنزیم صورت می پذیرد (۵). اما در افزایش فعالیت این آنزیم در کم کاری غده بایستی مکانیسمهای دیگری مؤثر باشند، زیرا در این حالت غلظت هورمون به علت تزریق داروی متی مازول کاهش یافته است. شاید بتوان این مسئله را شبیه به افزایش فعالیت آنزیم هگزوکیناز در کمبود اکسیژن دانست. در کاهش اکسیژن فعالیت آنزیم هگزوکیناز شدیداً افزایش یافته و میزان اسید لاکتیک حاصل در مغز بعد از یک دقیقه حالت آنوکسی به ۵ تا ۸ برابر می رسد (۱۱). مطالعات نشان می دهد که در کمبود تیروکسین نیز تجزیه اکسیژن از هموگلوبین دچار اختلال می گردد (۲). البته در ادامه بحث مشخص خواهد شد که در حالت کم کاری غده تیروئید فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز و به عبارت دیگر تولید اسید لاکتیک دچار افزایش نخواهد شد. همانگونه که در نمودار شماره ۲ مشاهده شد، در حالت کم کاری تجربی غده تیروئید فعالیت آنزیم LDH نسبت به کنترل کاهش یافته است. این امر با توجه به نقش هورمونهای تیروئیدی در افزایش فعالیت این آنزیم (۲)، کاملاً منطقی به نظر می رسد. در مورد آنزیم آکونیتاز، فعالیت این آنزیم در هیپو تیروئیدیسم تجربی در مقایسه

با کنترل، تغییر قابل ملاحظه ای را نشان نمی دهد. این نتیجه با توجه به عدم تأثیر هورمونهای تیروئیدی بر روی فعالیت آنزیمهای شرکت کننده، در سیکل کربس در داخل میتوکندری با کمک مغز قابل توجیه می باشد (۲). اما میزان ذخیره گلیکوژن در حالت کم کاری غده در حالی که در روز دهم دارای مقداری همانند گروه کنترل است. پس از آن در دوره های زمانی بعد افزایش چشمگیری یافته و با افزایش سن تأثیر داروی متی مازول در جهت سنتز گلیکوژن در مغز بیشتر می گردد و در ۷۰ روزگی این اختلاف بسیار معنی دار می گردد ($P < 0.001$) و افزایشی در حدود ۶ برابر نسبت به حیوانات طبیعی در این سن مشاهده می شود. از آنجا که بافت مغز جهت تولید انرژی از ذخیره گلیکوژن استفاده نمی نماید (۱۱) و منبع اصلی تأمین گلوکز مصرفی، قند خون می باشد. پس می توان افزایش آنزیم هگزوکیناز را با توجه به کاهش فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز و عدم تغییر فعالیت آنزیم آکونیتاز، در جهت افزایش فعالیت مسیر گلیکوژنز دانست.

میزان گلوکز تنها در Rat های بالغ مبتلا به هیپوتیروئیدیسم افزایش نشان می دهد، که می تواند به دلیل ذخیره بیش از حد گلیکوژن در این دسته از Rat ها باشد.

این افزایش گلیکوژن در بافت مغز در کم کاری تجربی غده تیروئید، شاید خود یکی از عوامل مؤثر در اختلالات مغزی در افراد مبتلا به این بیماری باشد.

منابع:

- ۱- صمتی فومن محمدصادق. اثر هورمونهای تیروئید روی فراکسیونهای مختلف چربی سرم و کبد. پایان نامه دکتری داروسازی. دانشگاه اصفهان: (۸۱)، ۱۳۶۵.
- ۲- نیکوکار مرضی. اثر هیپرتیروئیدیسم تجویزی بر فعالیت آنزیمهای هگزوکیناز، لاکتات دهیدروژناز و آکونیتاز در مغز رات در طول رشد. مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، ۱ (۱): ۷-۶، ۱۳۷۸.
- 3- Delong GR.; Adams RD. The neuromuscular system and brain in hypothyroidism. In: Brawerman LE.; Vtiger RD. The thyroid: From JB Lippincott Company. Philadelphia: USA, 6th ed. 1034-6, 1991.
- 4- Granner DK. Thyroid hormones. In: Murray RK.; Mays PA. Harpers biochemistry: From Appleton & Longe Company: USA, 24th ed. 537, 1990
- 5-Greengard O. Hormonal regulation of enzyme syntheses differentiating mammalian tissues. In: Hommes F.; Van Denberg CY. Normal and pathological development of energy metabolism: From Academic Press. London: UK, 55-9, 1975.
- 6- Greenspan F. Thyroid hormones. In: Greenspan F.; Forshan P. Basic and clinical endocrinology: From Pratic Hall International Inc. California: USA, 205, 1991.
- 7- Hall R. Thyroid. In: Hall R, Besser N. Fundamental of clinical endocrinology: From Longman Singapore Publishers, 4th ed. 73, 1989.
- 8- Ingbar SH. The thyroid gland. In: Wilson JW, Foster DW. Williams textbook of endocrinology: From WB Saunders Company. Philadelphia: USA, 7th ed. 152, 1974.
- 9- Katzung BG. Examination and board review pharmacology: From Appleton and Lang Company, 3rd ed. 209-10, 1993.
- 10- Oppenheimer JH. Tissue and cellular effects of thyroid hormones and their mechanism of action. In: Burrow GN.; Oppenheimer JH, Volpe R. Thyroid function and disease: From WB Saunders Company. Philadelphia: USA, 94-5, 1989.
- 11- Vanpilsune JF. Metabolism of individual tissue. In: Devlin TM. Textbook of biochemistry with clinical correlations: From John Wiley & Sons: Singapore, 837, 1986.